Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計と光ファイバーマイクロプローブによる 4 ºC の微量 DNA の純度測定

アプリケーションノート
製薬/生化学

著者

*Fyfe, DJ、 Comerford, JC**

*Fyfe Science, West Lakes Shore, SA 5020, Australia

** Agilent Technologies, 679 Springvale Road, Mulgrave 3179, Australia

概要

Agilent Cary 60 UV-Vis は、冷蔵保存されている微量の生物学サンプルを分析するのに理想的な分光光度計です。このアプリケーションノートでは、Cary 60 とマイクロ光ファイバーアクセサリを用いて、4 ºC で DNA の純度を測定する方法を紹介します。この方法により、データの精度や再現性を損なうことなく、時間とコストを大幅に削減できます。

- キュベットが不要
- 冷蔵保存されているサンプルを 4 ºC で分析
- 分析 1 回あたりの時間とコストを削減

はじめに

紫外可視分光光度計による DNA の純度と濃度測定は、1942 年に最初のメソッドが Warburg と Christian により開発され [1]、のちの 1989 年に Sambrook らによりラボでの簡単な高速測定のために最適化されて以来 [2]、長年にわたってバイオテクノロジー分野の効果的な分析手法として用いられています。分光光度計によるアプローチのおもな利点としては、測定が 1) 簡単、2) 精密で、3) サンプルを破壊しないという点が挙げられます。分析時間を短縮できるだけでなく、大量のサンプルや追加の消耗品を使う必要がないため、コスト面でも利点が得られます。

Agilent Technologies

以前の研究では、ウルトラマイクロキュベットを備えたAgilent Cary 50 UV-Vis 分光光度計により、室温で少量のDNA 純度を正確かつ高い再現性で測定できることを証明しました[3]。今回の研究では、光ファイバーを用いた新しい Cary 60 UV-Vis に対象を広げ、ラボでの蛍光灯による周囲照明条件下において、微量のサンプルを 4 ºC で分析しました。このアプローチは、サンプルをキュベットに充填して測定を行う従来の測定手法とは異なり、プローブをサンプルに直接導入して測定することができるため、短い時間で分析を完了できます。独自の高強度キセノンフラッシュランプと最新のエレクトロニクスを搭載した Cary 60 では、周囲照明の影響を受けずに吸光度の小さな変化を効果的にモニタリングできるため、こうしたアプローチが可能です。このアプローチの利点については、このアプリケーションノートでさらに紹介します。

装置と材料

部品番号	説明
G6860AA	Cary 60 UV-Vis、WinUV ソフトウェア、PC
7910035600	光ファイバーマイクロプローブ
G6866A	光ファイバープローブカップラ
6610000800	石英キュベット (1 cm 光路長; 2 個パック)
D-4764 (Sigma Chemical Company)	仔ウシ胸腺 DNA; 1 ユニット

手法と結果

0〜50 µg/mL の仔ウシ胸腺 DNA を純水 (MilliQ) に溶解しました。

図 1 に示すように、Cary 60 UV-Vis に光ファイバーカップラおよびマイクロプローブを設置しました。エッペンドルフチューブに入れた純水 (MilliQ) 150 µL のブランクを測定しました。

分子生物学用の試薬は通常、冷蔵庫で保管されるため、すべてのサンプルを冷蔵庫から取り出し 4 ºC ですぐに分析しました。

図 1. 光ファイバーアクセサリを装着した Cary 60 を用いて、エッペンドルフチューブ内の 4 ºC DNA サンプル 150 µL を測定しています

はじめに、WinUV 'RNA-DNA Estimation' ソフトウェアモジュールを用いて 340〜240 nm をスキャンし、既知サンプルを測定することによって、DNA サンプルの最大吸収ピークを確認しました (図 2)。

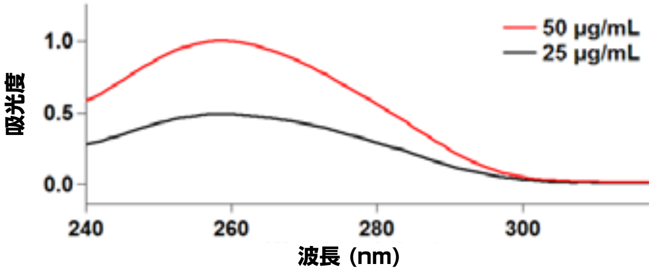

図 2. 2 種類の濃度における 4 ºC DNA サンプル 150 µL のスキャン結果は、260 nm に特徴的な吸収ピークを示しています。50 µg/mL DNA の吸収強度が 1.0 Abs であるのに対して、25 µg/mL DNA の吸収強度が 0.5 Abs となっているのは、ランベルト・ベールの法則に従っていることを示しています (A = ϵcl)

DNA 純度の確認には DNA サンプルの純度を自動的に計算する専用の WinUV ソフトウェアモジュール「RNA/DNA Estimation」を用いて、260/280 nm 吸収強度比の計算をおこないました。このアプリケーションは、図 3 に示すように、きわめて簡単です。分析は 1 分未満で完了しました。

図 3. 専用の Cary WinUV ソフトウェアによって、DNA の純度および濃度を自動的に計算します。

最後に、測定結果から濃度曲線をプロットし、同じラボの環境下でさまざまな濃度の DNA サンプルの分析値と直線性および再現性を評価しました (図 4)。DNA サンプルの分析と分析の間に、マイクロプローブを MilliQ 水で洗浄しました。

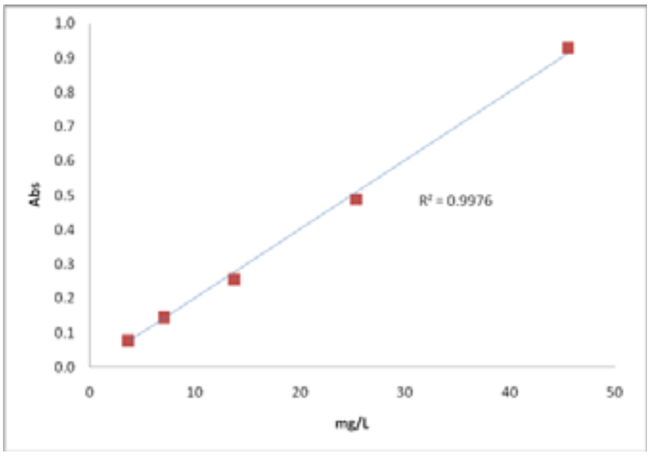

図 4. エッペンドルフチューブに入れた 4 ºC DNA サンプル 150 µL の濃度曲線 (0～50 µg/mL)。光ファイバーマイクロプローブアクセサリを用いて、蛍光灯のある通常のラボ照明条件下で測定。検量線方程式: 吸光度 = 0.02004* 濃度; 相関係数 = 0.9976

考察

5 検体すべてのサンプルの測定に要した時間は 2 分未満でした。マイクロキュベットを用いる従来の手法では、サンプルを解凍するまでの待ち時間や、測定と測定の間にマイクロキュベットを洗浄する時間が生じます。全体として、Cary 60 光ファイバーシステムを用いた分析の所要時間はおよそ 80 % で、大幅に短縮されます。また、光ファイバーを用いた手法では、サンプルの処理に起因する汚染が生じる可能性が低くなります。データの精度や、マイクロプローブを用いた低温サンプルの測定における大幅な時間の短縮は、DNA などの生物学サンプルの測定において、Cary 60 が簡単、高速、かつコスト効率がよい選択肢であることを示しています。このアプローチは、280 nm におけるタンパク質の測定など、別の種類のサンプルにも簡単に適用することが可能です。

結論

Cary 60 UV-Vis は、優れた感度と再現性を実現する独自の高エネルギーキセノンフラッシュランプを備えているため、光ファイバーサンプリングを用いた測定に最適です。このアプリケーションノートでは、DNA サンプルの測定における分析スピード、結果の再現性、使いやすさなど、Cary 60 UV-Vis の利点が示されました。

Cary 60 と光ファイバーを用いた生物学サンプル分析におけるその他の利点は、以下のとおりです。

- 凝縮の心配なく、高温から冷温サンプル (4 ºC –110 ºC) を測定できます。これに対して、これらの温度でキュベットを用いる場合、凝縮が生じ、精度や再現性の低下につながります。
- サンプル量の制約がありません。40 µL から大量サンプルまで、制限なく対応できます。
- 高価な石英マイクロキュベットを購入する必要はありません。時間のかかるキュベットの洗浄も不要です。
- 反射プローブを使えば、固体、粉末、ゲル状のサンプルを分析できます。

1. Warburg, O. and Christian, W. (1942) *Biochem Z.,* **310**; 384.
2. Sambrook, J., Fritsch, EF. and Manniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition, Cold Spring Haror Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
3. Keighley, B. and Fyfe, D. (1995) *Application Note* **#91**. www.agilent.com

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
Published May 19, 2011
5990-7863JAJP

Agilent Technologies